



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

패혈성 쇼크에서
칼리스타틴의 작용 기전

2019 년 2 월

서울대학교 대학원
의학과 응급의학전공
김 태 균

초 록

연구 목적

혈관내피 기능 장애는 패혈성 쇼크의 여러 중요한 병태생리 중 하나이다. 칼리스타틴은 체내에서 다양한 기전을 통하여 항염증 작용을 나타내며, endothelial nitric oxide synthase (eNOS)와 연관된 경로를 통하여 혈관내피 기능 장애를 감쇄하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 패혈증을 모방한 혈관내피 세포 모델에서 칼리스타틴이 혈관내피 생존력에 작용하는 기전을 확인하고, 패혈성 쇼크 환자에서 혈중 칼리스타틴 농도와 혈관내피 기능 장애와 연관된 표지자의 농도가 임상적인 예후와 연관성이 있는지 확인하고자 진행되었다.

연구 재료 및 방법

실험 연구를 위해 인간 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)를 다섯 군[아무 처리도 시행하지 않은 군(음성 대조군), control 짧은 간섭 리보핵산(small interfering ribonucleic acid, siRNA) 형질주입만 시행한 군(control siRNA군), control siRNA 형질주입과 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 처리를 시행한 군(control siRNA + LPS군), SERPINA4 siRNA 형질주입만 시행한 군(SERPINA4 siRNA군), 그리고 SERPINA4 siRNA 형질주입과 지질다당류 처리를 시행한 군(SERPINA4 siRNA + LPS군)]으로 나누었다. 각 군별로 세포 생존력, 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도, 그리고 eNOS 농도를 측정하였다.

또한 패혈성 쇼크로 중환자실에 입원한 환자로부터 입원 시점, 입원 24

시간 후, 입원 72 시간 후 채혈한 혈액과 건강한 자원자로부터 채혈한 혈액을 이용하여 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)를 통해 혈중 칼리스타틴, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-selectin 농도를 측정한 임상 연구를 진행하였다. 임상 연구의 일차 결과 변수는 28일 사망으로 설정하였다.

연구 결과

SERPINA4 siRNA군에서는 음성 대조군(2.5 ± 0.7 pg/mL 대 21.1 ± 2.1 pg/mL, $P < 0.001$)이나 control siRNA 군(20.5 ± 3.3 pg/mL, $P < 0.001$)과 비교했을 때 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도가 감소하였다. Control siRNA + LPS군의 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도는 control siRNA 군과 비교했을 때 유의하게 감소하였다(12.0 ± 2.3 pg/mL 대 21.3 ± 3.6 pg/mL, $P = 0.046$). SERPINA4 siRNA군(3.2 ± 1.4 pg/mL, $P < 0.001$)과 SERPINA4 siRNA + LPS군(3.6 ± 1.9 pg/mL, $P < 0.001$)의 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도는 control siRNA군과 비교했을 때 매우 낮게 측정되었으며, 두 군 사이에 유의한 칼리스타틴 농도 차이는 관찰되지 않았다($P = 0.999$). SERPINA4 siRNA + LPS군의 24 시간 생존력($58.0 \pm 3.7\%$)은 음성 대조군($100 \pm 7.9\%$, $P = 0.001$), control siRNA군($98.2 \pm 9.0\%$, $P = 0.002$), 그리고 SERPINA4 siRNA 군($93.3 \pm 4.7\%$, $P = 0.007$)과 비교했을 때 유의하게 감소하였다. Control siRNA + LPS군(4.1 ± 0.1 ng/mL, $P = 0.041$)과 SERPINA4 siRNA군(4.1 ± 0.1 ng/mL, $P = 0.041$)의 세포 배양액 내 eNOS 농도는 control siRNA군(4.5 ± 0.1 ng/mL)과 비교했을 때 낮게 측정되었다. SERPINA4 siRNA + LPS군의 세포

배양액 내 eNOS 농도(3.7 ± 0.1 ng/mL)는 음성 대조군(4.5 ± 0.1 ng/mL, $P < 0.001$), control siRNA군($P < 0.001$), control siRNA + LPS군($P = 0.021$), 그리고 SERPINA4 siRNA군($P = 0.021$)에 비해 유의하게 낮게 측정되었다.

임상 연구에는 총 72 명의 환자(생존군 58 명, 사망군 14 명)와 6 명의 건강한 자원자가 연구에 참여하였다. 건강한 자원자에 비해 환자군에서는 입원 당시 혈중 칼리스타틴 농도가 낮게, 혈중 VCAM-1과 E-selectin 농도가 높게 측정되었다. 생존군과 비교했을 때 사망군에서는 세 시점 모두에서 혈중 칼리스타틴 농도가 낮게 측정되었다[입원 시, $4.4 \mu\text{g/mL}$ ($2.9\text{--}6.1 \mu\text{g/mL}$) 대 $2.5 \mu\text{g/mL}$ ($2.1\text{--}5.0 \mu\text{g/mL}$), $P = 0.019$; 24 시간 후, $4.3 \mu\text{g/mL}$ ($3.3\text{--}5.2 \mu\text{g/mL}$) 대 $3.2 \mu\text{g/mL}$ ($2.2\text{--}3.8 \mu\text{g/mL}$), $P = 0.004$; 72 시간 후, $3.1 \mu\text{g/mL}$ ($2.5\text{--}4.2 \mu\text{g/mL}$) 대 $2.3 \mu\text{g/mL}$ ($1.7\text{--}3.1 \mu\text{g/mL}$), $P = 0.012$]. 반면 혈중 VCAM-1이나 E-selectin 농도는 두 군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 다변수 로지스틱 회귀 분석에서, 입원 24 시간 후 측정한 혈중 칼리스타틴 농도는 28 일 사망과 독립적인 연관성이 관찰되었다(교차비, 0.29; 95% 신뢰구간, 0.08–0.69, $P = 0.024$).

결론

SERPINA4 siRNA군에서는 음성 대조군이나 control siRNA군과 비교했을 때 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도가 유의하게 감소하였다. SERPINA4 siRNA + LPS군에서는 음성 대조군과 비교했을 때 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도가 유의하게 감소하였고, 음성 대조군, control siRNA군, 그리고 SERPINA4 siRNA군과 비교했을 때 세포

생존력이 감소하였으며, 음성 대조군, control siRNA군, control siRNA + LPS군, 그리고 SERPINA4 siRNA군과 비교했을 때 세포 배양액 내 eNOS 농도가 유의하게 감소하였다. 패혈성 쇼크 환자에서 입원 24 시간 후 측정된 낮은 혈중 칼리스타틴 농도는 28 일 사망과 독립적인 연관성이 관찰되었으나, 혈중 VCAM-1이나 E-selectin 농도는 28 일 사망과의 연관성이 관찰되지 않았다.

주요어: 패혈증, 혈관내피 기능 장애, 생체표지자

학 번: 2017-30022

목차

제1 장 서론	1
제1 절 연구 배경	1
제1 항 패혈증과 패혈성 쇼크.....	1
제2 항 패혈성 쇼크에서 혈관내피 기능 장애.....	2
제3 항 칼리스타틴과 혈관내피 기능 장애	3
제2 절 연구 가설	5
제3 절 연구 목표	6
제2 장 연구 재료 및 방법	7
제1 절 실험 연구	7
제1 항 세포 배양	8
제2 항 짧은 간접 리보핵산 형질주입.....	9
제3 항 지질다당류 처리	10
제4 항 칼리스타틴 농도 측정.....	11
제5 항 세포 생존력 측정	12
제6 항 eNOS 농도 측정	13
제7 항 통계 분석	14
제2 절 임상 연구	15
제1 항 연구 설정 및 설계.....	15
제2 항 임상 진료와 자료 수집	17
제3 항 효소결합면역흡착검사.....	18
제4 항 결과 변수	19

제5 항 통계 분석	20
제3 장 연구 결과	21
제1 절 실험 연구	21
제1 항 siRNA 형질주입에 따른 칼리스타틴 농도 비교	21
제2 항 siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 칼리스타틴 농도 비교	23
제3 항 siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 세포 생존력 비교	25
제4 항 siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 eNOS 농도 비교	27
제2 절 임상 연구	29
제1 항 연구 대상자	29
제2 항 기본 인구통계학적 특성 및 임상적 특성	30
제3 항 혈중 칼리스타틴, VCAM-1, E-selectin 농도 비교	37
제4 항 로지스틱 회귀 분석	42
제4 장 고찰	46
제5 장 결론	51
이해관계의 충돌 등에 관한 명기	52
참고문헌	53

Abstract	58
----------------	----

표 목차

[표 1] 28 일 사망 여부에 따른 기본 인구통계학적 자료	31
[표 2] 건강한 자원자, 28 일 생존군, 28 일 사망군 간의 혈중 칼리스타틴, VCAM-1, E-selectin 농도의 비교	40
[표 3] 28 일 사망에 대한 로지스틱 회귀 분석 결과.....	43

그림 목차

[그림 1] 패혈증 환자에서 활성화된 혈관내피.....	2
[그림 2] 칼리스타틴의 항염증 작용	4
[그림 3] 칼리스타틴의 세포 자멸사 억제	4
[그림 4] 실험 연구의 비교군 설정	7
[그림 5] siRNA 형질주입에 따른 HUVEC 배양액 내 칼리스타틴 농도	22

[그림 6] siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 HUVEC 배양액 내 칼리스타틴 농도.....	24
[그림 7] siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 HUVEC의 24 시간 생존력	26
[그림 8] siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 HUVEC 배양액 내 eNOS 농도	28
[그림 9] 임상 연구 흐름도.....	29
[그림 10] 건강한 자원자와 입원 시, 입원 24 시간 후, 입원 72 시간 후 환자로부터 측정된 혈중 칼리스타틴, VCAM-1, E-selectin 농도를 나타낸 상자 수염 그림	38

제1 장 서론

제1 절 연구 배경

제1 항 패혈증과 패혈성 쇼크

패혈증의 정의와 치료 지침에 대한 국제적인 합의가 이루어진 이래(1) 패혈증의 예후와 사회적인 비용에 대한 관심은 꾸준히 지속되고 있다. 최근 발표된 정의에 따르면 패혈증은 감염에 대한 숙주의 조절되지 않은 반응에 의해 발생하는 생명을 위협하는 장기 기능 장애로 알려져 있고, 패혈증의 더 심각한 형태인 패혈성 쇼크는 적절한 혈압을 유지하기 위해 승압제 투여가 필요하고 혈청 젖산 농도가 상승해 있는 상태를 일컫는다(2). 패혈증과 패혈성 쇼크의 발병률은 계속 증가하고 있고, 패혈증과 패혈성 쇼크의 병인이나 치료에 관한 지식이 발전했음에도 불구하고 이와 연관된 사망률은 여전히 높은 상태이다(3-5).

제2 항 패혈성 쇼크에서 혈관내피 기능 장애

혈관내피 기능 장애는 패혈성 쇼크의 병태생리에서 중요한 기전 중의 하나이다(6). 혈관내피 기능 장애는 혈관투과성의 증가, 세포부착의 촉진, 응고경향의 증가, 혈관긴장도의 변화, 그리고 혈관내피세포의 세포자멸사 등을 특징으로 한다(그림 1) (7-9). Angiopoietin-1, angiopoietin-2, von Willebrand Factor, ADAMTS13, ICAM-1, E-selectin, VEGF 등 다양한 생물표지자들이 혈관내피 기능 장애와 연관되어 있음이 알려져 있고(10) 일부 연구에서는 이러한 생물표지자들과 패혈증 환자의 임상적인 결과 사이에 연관이 있다고 보고되기도 하였으나 그 결과가 일관되게 보고되고 있지는 않다(4, 5, 11).

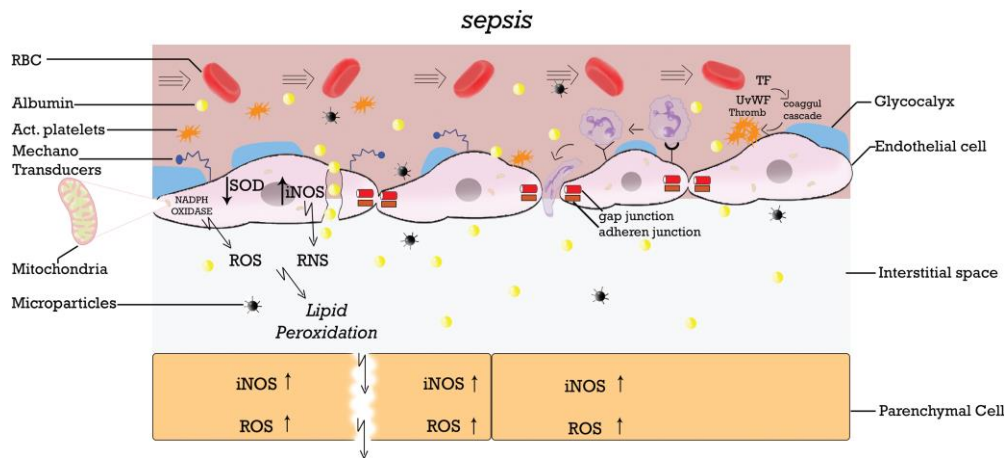


그림 1. 패혈증 환자에서 활성화된 혈관내피. Ince 등의 연구에서 발췌(9).

제3 항 칼리스타틴과 혈관내피 기능 장애

칼리스타틴(kallistatin)은 세린 프로테아제 억제제(serine protease inhibitor)로, 1980년대에 Chao 등에 의해 칼리크레인(kallikrein) 결합 단백질로서 발견된 이후(12) 체내에서 다양한 작용에 관여하고 있음이 밝혀져 왔다. 칼리스타틴은 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 high mobility group box-1 (HMGB1)의 억제를 통해 항염증작용을 나타내고(13, 14), TNF- α , endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 등 다양한 물질과 연관된 경로를 통하여 혈관내피 기능 장애를 감쇄하는 것으로 알려져 있다(그림 2, 3) (14-16). 인체 내에서 칼리스타틴은 다양한 조직에 분포하고 있으며, 주로 간세포와 신장의 근위세뇨관 세포에서 생성되는 것으로 알려져 있다(17). 또한 패혈증, 간질환, 지역사회 획득 폐렴 등의 환자에서 건강인에 비해 혈중 칼리스타틴 농도가 감소하는 것이 알려져 있는데(17, 18), 최근의 한 연구에서는 패혈증 환자에서 칼리스타틴의 혈중 농도의 저하가 불량한 예후와 연관이 있을 수 있다고 보고하였고, 칼리스타틴 외에 TNF- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 등의 혈중 농도를 측정하여 그 결과를 함께 보고한 바 있다(19). 그러나 아직까지 패혈성 쇼크 환자에서 혈중 칼리스타틴 농도와 혈관내피 기능 장애, 그리고 예후 사이의 관계에 대해서는 알려진 바가 많지 않다.

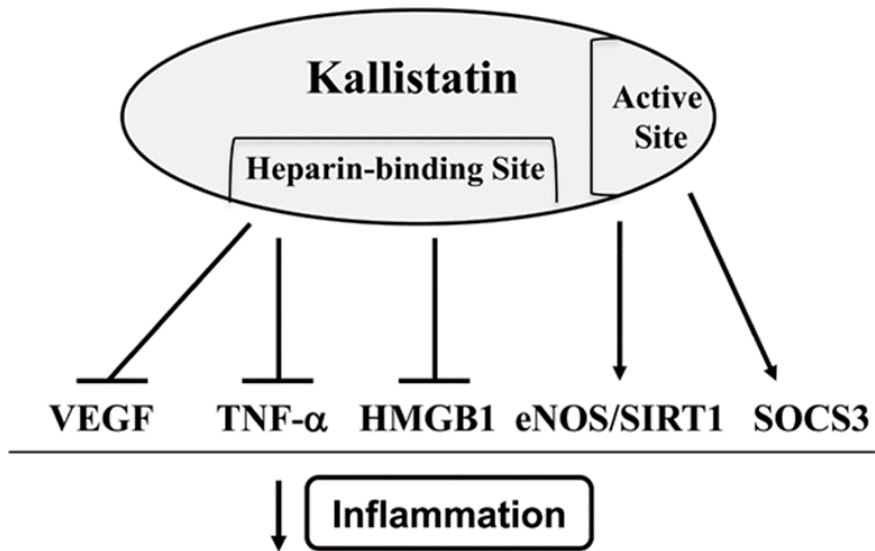


그림 2. 칼리스타틴의 항염증 작용. Chao 등의 연구에서 발췌 (20)

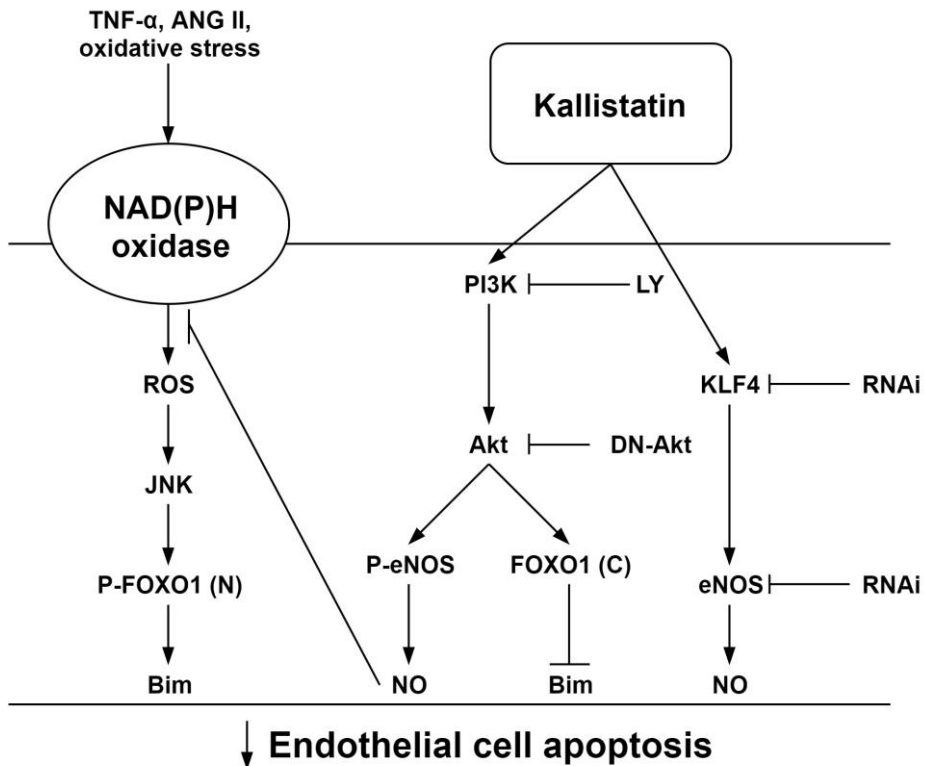


그림 3. 칼리스타틴의 세포 자멸사 억제. Shen 등의 연구에서 인용 (15).

제2 절 연구 가설

- 칼리스타틴은 eNOS와 연관된 경로를 통하여 혈관내피 세포 자멸사를 감쇄하는 것으로 알려져 있다. 따라서 혈관내피 세포에서 칼리스타틴 유전자 녹아웃(knockout)에 의한 칼리스타틴 농도의 저하는 혈관내피 세포를 이용한 패혈증 모형에서 eNOS의 발현을 감소시키고 혈관내피 세포 자멸사를 증가시킬 것이다.
- 패혈성 쇼크 환자에서는 다양한 병태생리 중 한 가지인 혈관내피 기능 장애가 발생하는 것으로 알려져 있다. 패혈증이나 패렴 환자에서와 유사하게, 패혈성 쇼크 환자에서는 혈중 칼리스타틴 농도가 감소할 것이다. 또한 패혈성 쇼크 환자에서 혈관내피 기능 장애의 감쇄 정도는 혈중 칼리스타틴 농도와 연관되어 있을 것이다. 즉, 혈중 칼리스타틴 농도가 더 낮은 환자군에서 혈관내피 기능 장애가 더 심할 것이고, 이는 불량한 예후와 연관되어 있을 것이다.

제3 절 연구 목표

- 혈관내피 세포를 이용한 패혈증 세포 모델 실험을 통하여 칼리스타틴이 혈관내피 세포에서 작용하는 기전을 확인하고, 칼리스타틴 생성의 억제와 혈관내피 보호 작용 간의 관계를 확인한다.
- 패혈성 쇼크 환자에서 칼리스타틴, VCAM-1, E-selectin 등 혈관내피 기능 장애와 연관된 물질의 혈중 농도를 측정하여 칼리스타틴이 혈관내피 기능 장애와 예후에 미치는 영향을 확인한다.
- 패혈성 쇼크 환자에서 칼리스타틴 유래 물질의 투여 등 새로운 치료법의 근거가 되는 지식을 생산한다.

제2 장 연구 재료 및 방법

제1 절 실험 연구

실험에 사용한 비교군들에 대한 개략적인 내용을 그림 4에 정리하였다.

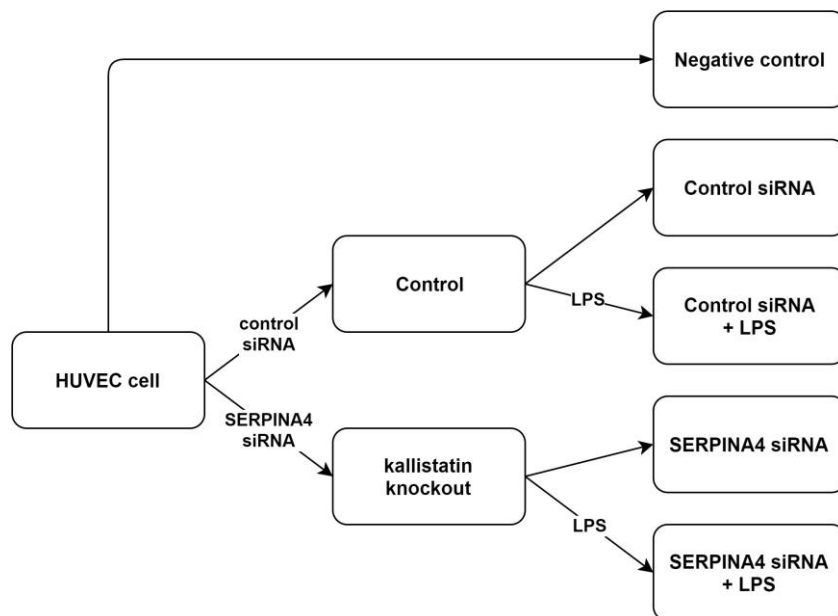


그림 4. 실험 연구의 비교군 설정.

HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; siRNA, small interfering ribonucleic acid; LPS, lipopolysaccharide.

제1 항 세포 배양

인간 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC; 카탈로그 번호 C2517AS, Lonza, Walkersville, MD, USA)를 37℃, 5% 이산화탄소 환경에서 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS) 농도의 Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit™ (EGM™-2, 카탈로그 번호 CC3162; Lonza, Walkersville, MD, USA)에 24 시간 동안 배양하였다. HUVEC이 90% 군집을 이루었을 때 96-well plate 혹은 6-well plate에 각각 한 well당 2×10^4 개, 2×10^6 개씩 파종(seeding)하여 실험에 이용하였다.

제2 항 짧은 간섭 리보핵산 형질주입

배양된 HUVEC을 칼리스타틴 발현 억제 실험군과 대조 실험군으로 나누어 각각 인간 칼리스타틴 유전자인 SERPINA4에 대한 짧은 간섭 리보핵산(small interfering ribonucleic acid, siRNA; 25 nM, target sequence: 5' -GGUGAGAGUUGCAGUAACA-3' , 5' -CAAUCC-AGCUUAUCAACGA-3' , 5' -CCACCAGCUUCGCGAUCAA-3' , 5' -GCAAAAUG-AGGGAGAUUGA-3') (ON-TARGETplus Human SERPINA4 (5267) siRNA - SMARTpool, 카탈로그 번호 L016371000050, Dharmacon, Lafayette, CO, USA)와 siGLO RISC-Free Control siRNA (카탈로그 번호 D0016000105, Dharmacon, Lafayette, CO, USA)를 이용한 형질주입(transfection)을 시행하였다. siRNA 형질주입은 6 시간 동안 이루어졌고, 형질주입된 HUVEC을 완전배양액(complete medium)에서 추가로 18 시간 동안 배양하였다. 비교를 위하여 아무 처리도 시행하지 않은 음성 대조군을 추가로 배양하여 실험에 사용하였다.

제3 항 지질다당류 처리

형질 주입과 배양이 완료된 HUVEC을 다시 두 군으로 나누어 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)를 처리하거나 혹은 처리하지 않았고, 이후 소 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 제거한 완전배양액에서 24 시간 배양하였다.

제4 항 칼리스타틴 농도 측정

세포 배양액의 칼리스타틴 농도 측정에는 SERPINA4 (Human) ELISA Kit (카탈로그 번호 KA3892, Abnova, Walnut, CA, USA)를 사용하였다.

제5 항 세포 생존력 측정

HUVEC의 24 시간 생존력 측정을 위해 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)를 이용하였다.

제6 항 eNOS 농도 측정

Human eNOS ELISA Kit (카탈로그 번호 MBS8291345, MyBioSource, San Diego, CA, USA)를 이용하여 세포 배양액으로부터 eNOS 농도를 측정하였다.

제7 항 통계 분석

실험 연구를 통해 획득한 모든 연속형 자료는 평균 \pm 표준오차로 표기되었다. 실험 결과의 분석을 위해 분산 분석 (analysis of variance, ANOVA)과 Tukey의 사후 검정을 이용하였다. 양측 검정 유의 수준 (P value) 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였다. 분석에는 R 버전 3.5.1 (R Foundation)을 사용하였다.

제2 절 임상 연구

제1 항 연구 설정 및 설계

임상 연구는 전향적으로 수집된 자료에 대한 후향적인 관찰 연구로 계획되었다. 본 연구의 연구 프로토콜은 서울대학교병원 의학연구윤리심의위원회의 승인을 받아 진행되었다(IRB No. 1710-072-893; IRB No. 1408-003-599; IRB No. 1012-140-347). 연구에 사용된 자료와 혈액은 2013년 3월 1일부터 2015년 12월 31일까지 서울대학교병원 응급중환자실에 입원한 패혈성 쇼크 환자들로부터 수집되었다. 패혈증은 감염의 결과로 인하여 네 가지의 기준[(1) 체온 $> 38^{\circ}\text{C}$ 혹은 $< 36^{\circ}\text{C}$; (2) 분당 심박수 > 90 회; (3) 분당 호흡수 > 20 회 혹은 $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$; (4) 혈중 백혈구 수 $> 12,000/\text{mm}^3$ 혹은 $< 4,000/\text{mm}^3$ 혹은 미성숙 호중구 $> 10\%$]중 두 가지 이상을 만족하는 경우로 정의하였고, 패혈성 쇼크는 기준에 발표된 지침에 따라 적절한 혈압을 유지하기 위해 승압제 투여가 요구되는 불응성 저혈압을 동반한 패혈증으로 정의하였다(1). 패혈증과 패혈성 쇼크는 응급중환자실 입원 시점에 응급중환자실 당직의에 의해 진단되었다. 입원 환자에서 채혈은 표준화된 진료 프로토콜에 따라 입원 직후, 입원 24 시간 후, 그리고 입원 72 시간 후 총 세 차례 이루어졌다. 모든 연구 참여 환자로부터 고지에 입각한 서면 동의를 구득하였고, 환자의 의식 수준이 동의를 구득하기에 부적절할 경우 환자의 법정 대리인으로부터 서면 동의를 구득하였다. 감염 병소와 무관하게 패혈성 쇼크로 진단된 환자는 연구 참여 대상으로 선정되었고,

연구 참여에 동의하지 않거나, 3 회의 채혈을 완료하지 못하거나, 분석 당시 보관되어 있는 혈액량이 분석에 충분하지 않거나, 28 일 생존을 확인할 수 없었던 환자는 연구에서 제외되었다. 대조군 설정을 위하여 인터넷 웹사이트에 게시된 모집 공고문을 통하여 건강한 자원자를 모집하였고, 모집된 자원자로부터 고지에 입각한 서면 동의를 구득한 후 혈액 채혈을 하였다. 연구 참여 대상으로부터 채혈된 혈액은 분석 전까지 영하 80도씨의 냉동고에 보관되었다.

제2 항 임상 진료와 자료 수집

연구에 참여한 패혈성 쇼크 환자들은 패혈증 치료에 대한 국제 지침(21)에 따른 혈액학적인 보조와 항생제, 승압제 투여 등의 치료를 받았다. 감염원이 제거 가능할 경우 이를 제거하기 위한 노력을 시행하였다. 연구 대상자가 응급중환자실에 입원하는 시점에 인구통계학적인 자료와 검사 결과를 수집하였고, 첫 6 시간 동안의 Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) 점수를 계산하였다. 입원 24 시간 후, 입원 72 시간 후에도 동일하게 검사 결과를 수집하고 SOFA 점수를 계산하였다.

제3 항 효소결합면역흡착검사

연구 대상 환자로부터 입원 직후, 입원 24 시간 후, 입원 72 시간 후 채혈한 혈액 검체와 건강한 자원자로부터 채혈한 혈액 검체로부터 혈중 칼리스타틴, VCAM-1, E-selectin 농도를 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)를 이용하여 이중으로(duplicates) 측정하였다. 혈중 칼리스타틴, VCAM-1, E-selectin 농도 측정을 위하여 Human Serpin A4/Kallistatin DuoSet ELISA (R&D Systems, catalog number DY1669, Minneapolis, MN), Human sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, catalog number DVC00), 그리고 Human sE-Selectin/CD62E Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, catalog number DSLE00)이 각각 사용되었다.

제4 항 결과 변수

일차 결과 변수는 28일 사망으로 설정하였다.

제5 항 통계 분석

자료는 평균 \pm 표준편차, 중간값(사분위 범위) 혹은 빈도(%)로 제시되었다. 범주형 자료는 카이제곱 검정이나 피셔의 정확한 검정을, 연속형 자료는 스튜던트의 t 검정이나 맨-휘트니 U 검정을 적절히 이용하여 분석하였다. 양측 검정 유의 수준(P value) 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였다. 28 일 사망에 대하여 단변수 로지스틱 회귀 분석을 시행하였고, 단변수 분석에서 유의 확률 0.10 미만인 변수들을 이용하여 단계적 선택법을 통해 28 일 사망에 대한 다변수 로지스틱 회귀 모형을 구하였다. 결측값은 동일 군 내에서 측정 가능한 값들의 평균으로 대체하였다. 모든 통계 분석에는 R 버전 3.5.1 (R Foundation)을 이용하였다.

제3 장 연구 결과

제1 절 실험 연구

제1 항 siRNA 형질주입에 따른 칼리스타틴 농도 비교

아무 처리도 시행하지 않은 군(음성 대조군)과 control siRNA 형질주입을 한 군(control siRNA군) 사이에는 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도의 유의한 차이가 관찰되지 않았다(21.1 ± 2.1 pg/mL 대 20.5 ± 3.3 pg/mL, $P = 0.981$). 그러나 SERPINA4 siRNA 형질주입을 한 군(SERPINA4 siRNA군; 2.5 ± 0.7 pg/mL)에서는 음성 대조군이나($P < 0.001$) control siRNA군과 비교했을 때($P < 0.001$) 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도가 감소하였다(그림 5).

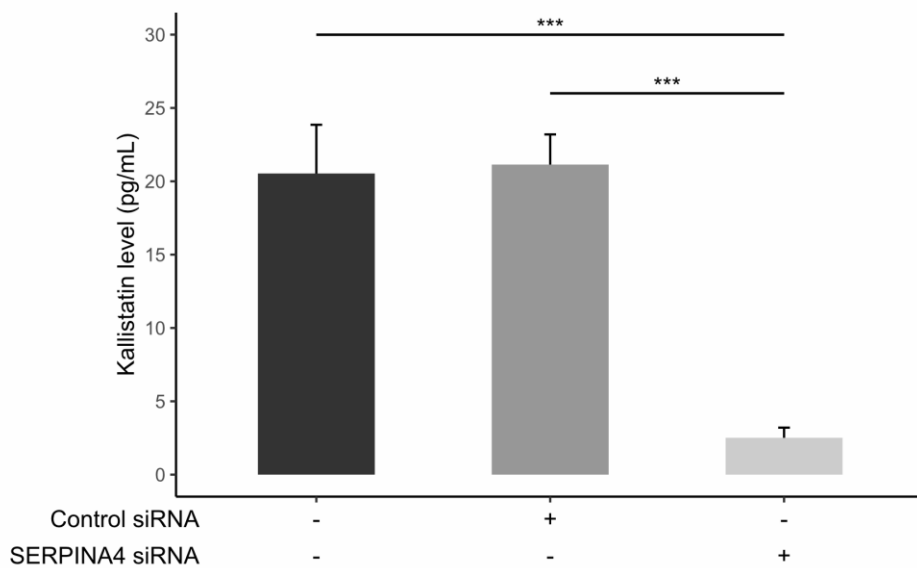


그림 5. siRNA 형질주입에 따른 HUVEC 배양액 내 칼리스타틴 농도.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

siRNA, small interfering ribonucleic acid; mRNA, messenger ribonucleic acid; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

제2 항 siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 칼리스트타틴 농도 비교

Control siRNA 형질주입 후 지질다당류를 처리한 군(control siRNA + LPS군)에서는 control siRNA군과 비교했을 때 세포 배양액 내의 칼리스트타틴 농도가 유의하게 감소하였다(12.0 ± 2.3 pg/mL 대 21.3 ± 3.6 pg/mL, $P = 0.046$). SERPINA4 siRNA군(3.2 ± 1.4 pg/mL, $P < 0.001$)과 SERPINA4 siRNA 형질주입 후 지질다당류를 처리한 군(SERPINA4 siRNA + LPS군; 3.6 ± 1.9 pg/mL, $P < 0.001$)의 세포 배양액 내 칼리스트타틴 농도는 control siRNA군과 비교했을 때 매우 낮게 측정되었으며, 두 군 사이에 유의한 칼리스트타틴 농도 차이는 관찰되지 않았다($P = 0.999$) (그림 6).

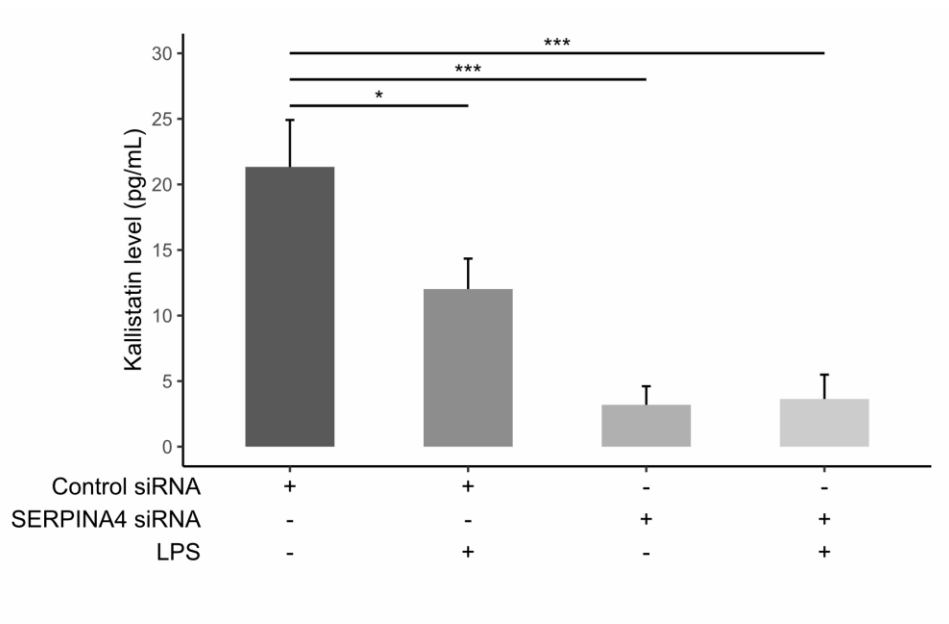


그림 6. siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 HUVEC 배양액 내 칼리스타틴 농도.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

siRNA, small interfering ribonucleic acid; LPS, lipopolysaccharide; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

제3 항 siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 세포 생존력 비교

Control siRNA + LPS군의 24 시간 생존력($82.9 \pm 7.5\%$)은 음성 대조군($100 \pm 7.9\%$, $P = 0.411$)이나 control siRNA군($98.2 \pm 9.0\%$, $P = 0.521$)과 비교했을 때 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 SERPINA4 siRNA + LPS군($58.0 \pm 3.7\%$)은 음성 대조군($P = 0.001$), control siRNA군($P = 0.002$), 그리고 SERPINA4 siRNA군과 비교했을 때($93.3 \pm 4.7\%$, $P = 0.007$) 24 시간 생존력이 유의하게 낮았다(그림 7).

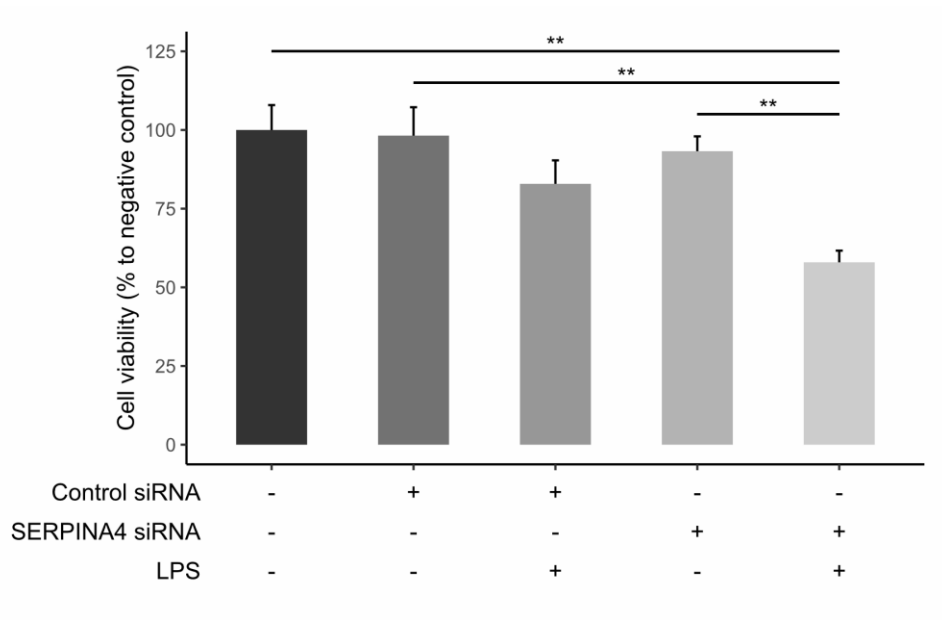


그림 7. siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 HUVEC의 24 시간 생존력.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

siRNA, small interfering ribonucleic acid; LPS, lipopolysaccharide; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

제4 항 siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 eNOS 농도 비교

Control siRNA군(4.5 ± 0.1 ng/mL)과 비교했을 때 control siRNA + LPS군(4.1 ± 0.1 ng/mL, $P = 0.041$)과 SERPINA4 siRNA군(4.1 ± 0.1 ng/mL, $P = 0.041$)의 세포 배양액 내 eNOS 농도가 낮게 측정되었다. SERPINA4 siRNA + LPS군의 세포 배양액 내 eNOS 농도(3.7 ± 0.1 ng/mL)는 음성 대조군(4.5 ± 0.1 ng/mL, $P < 0.001$), control siRNA군($P < 0.001$), control siRNA + LPS군($P = 0.021$), 그리고 SERPINA4 siRNA군(4.1 ± 0.1 ng/mL, $P = 0.021$)과 비교했을 때 모두 유의하게 낮게 측정되었다(그림 8).

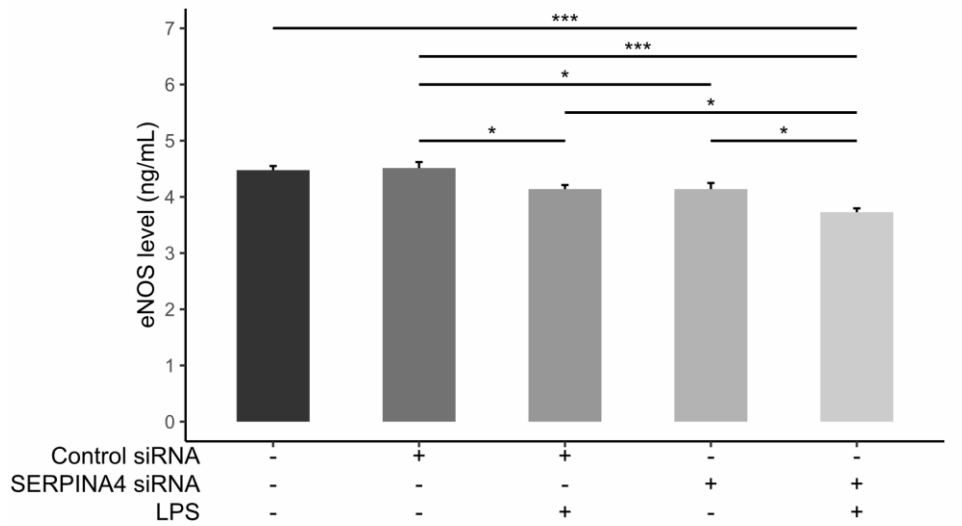


그림 8. siRNA 형질주입과 지질다당류 처리에 따른 HUVEC 배양액 내 eNOS 농도.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

siRNA, small interfering ribonucleic acid; LPS, lipopolysaccharide; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; eNOS, endothelial nitric oxide synthase.

제2 절 임상 연구

제1 항 연구 대상자

연구 기간 동안 297 명의 패혈성 쇼크 환자가 응급중환자실에 입원하였고, 사전에 명기된 제외 기준에 의거하여 225 명의 환자가 연구에서 제외되어 최종적으로 72 명의 환자가 연구에 등록되었다(그림 9). 건강한 자원자는 6 명(남성 3 명, 여성 3 명; 연령의 중간값, 만 37 세)이 연구에 등록되었다.

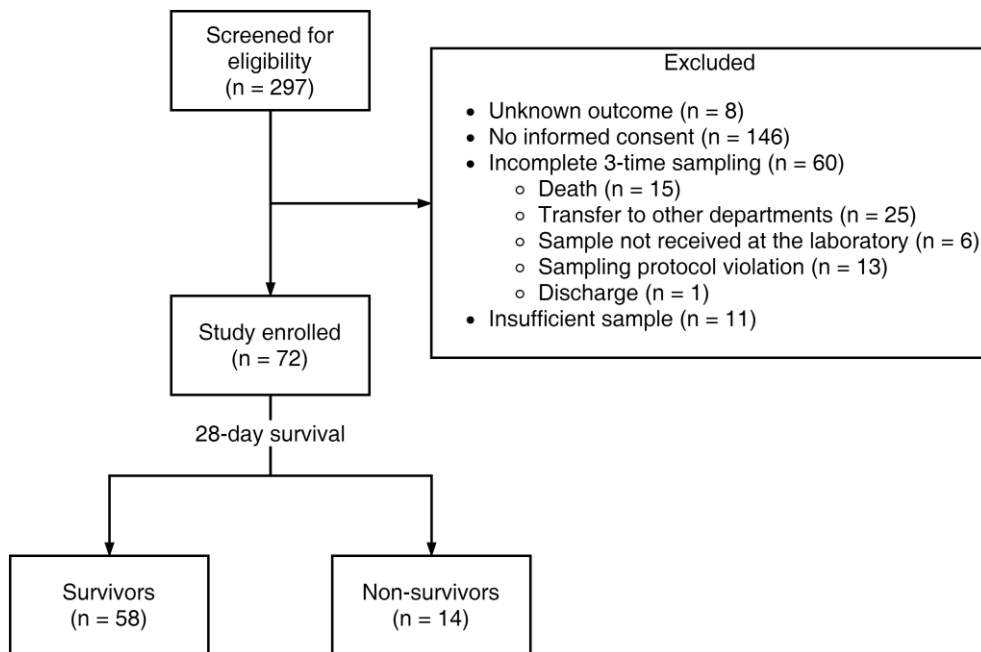


그림 9. 임상 연구 흐름도.

제2 항 기본 인구통계학적 특성 및 임상적 특성

환자의 기본 인구통계학적 및 임상적 특성은 표 1에 기술하였다. 간단히 요약하자면, 28 일 생존군과 사망군 사이에 연령, 성별, 기저 질환, 감염 병소에 있어 유의한 차이는 보이지 않았다. 생존군은 사망군과 비교했을 때 입원 시 혈중 백혈구 수치가 더 높았고($P = 0.027$), 24 시간 및 72 시간 후 SOFA 점수가 더 낮았고(24 시간, $P < 0.001$; 72 시간, $P = 0.005$), 72 시간 후 혈중 젖산(lactate) 농도가 더 낮았다($P = 0.003$).

	Survivors (n = 58)	Non-survivors (n = 14)	<i>P</i> value
Age, years	69.7 ± 10.8	68.9 ± 10.5	0.823
Male sex, n (%)	32 (55.2%)	10 (71.4%)	0.421
Underlying diseases			
Hypertension, n (%)			0.933
No	34 (58.6%)	9 (64.3%)	
Yes	24 (41.4%)	5 (35.7%)	
Diabetes mellitus, n (%)			0.113
No	44 (75.9%)	7 (50.0%)	
Yes	14 (24.1%)	7 (50.0%)	
Chronic liver disease, n (%)			0.894
No	49 (84.5%)	11 (78.6%)	
Yes	9 (15.5%)	8 (57.1%)	
Congestive heart failure, n (%)			0.172

No	57 (98.3%)	12 (85.7%)	
Yes	1 (1.7%)	2 (14.3%)	
Chronic lung disease, n (%)			1.000
No	54 (93.1%)	13 (92.9%)	
Yes	4 (6.9%)	1 (7.1%)	
Chronic kidney disease, n (%)			0.098
No	56 (96.6%)	13 (92.9%)	
Yes, without RRT	0 (0.0%)	1 (7.1%)	
Yes, with RRT	2 (3.4%)	0 (0.0%)	
Solid malignancy, n (%)			0.258
No	38 (65.5%)	6 (42.9%)	
Yes, without metastasis	15 (25.9%)	5 (35.7%)	
Yes, with metastasis	4 (6.9%)	3 (21.4%)	
NED	1 (1.7%)	0 (0.0%)	
Hematologic malignancy, n (%)			1.000
No	55 (94.8%)	13 (92.9%)	
Yes	3 (5.2%)	1 (7.1%)	

Chronic neurologic disease			0.983
No	47 (81.0%)	12 (85.7%)	
Yes	11 (19.0%)	2 (14.3%)	
Immunosuppressant			1.000
No	57 (98.3%)	14 (100.0%)	
Yes	1 (1.7%)	0 (0.0%)	
Transplantation			1.000
No	57 (98.3%)	14 (100.0%)	
Yes	1 (1.7%)	0 (0.0%)	
Infection site, n (%)			0.087
Lung	13 (22.4%)	6 (42.9%)	
Urinary tract	14 (24.1%)	2 (14.3%)	
Gastrointestinal tract	8 (13.8%)	4 (28.6%)	
Hepatobiliary system	19 (32.8%)	0 (0.0%)	
Bone, joint, soft tissue	3 (5.2%)	1 (7.1%)	
Unknown	1 (1.7%)	1 (7.1%)	

Source control, n (%)

Any [†]	17 (29.3%)	1 (7.1%)	0.169
Surgery	1 (1.7%)	0 (0.0%)	1.000
Radiographic intervention	11 (19.0%)	1 (7.1%)	0.506
Other intervention	8 (13.8%)	0 (0.0%)	0.317

Parameters at admission

Blood WBC count, 1000/ μ L	14.0 (7.5–22.0)	8.7 (2.2–13.0)	0.027
Blood hemoglobin level, g/dL	10.0 (8.6–12.0)	9.3 (8.2–10.2)	0.174
SOFA score (0 to 6 h)	11.0 (9.0–13.0)	12.5 (11.0–14.0)	0.145
P/F ratio, mmHg	252.0 (139.0–363.8)	184.8 (95.0–311.7)	0.298
Blood platelet count, 1000/ μ L	130.0 (73.5–216.0)	93.0 (72.0–189.0)	0.286
Serum total bilirubin, mg/dL	1.2 (0.8–3.3)	0.9 (0.6–2.8)	0.578
CV SOFA score (0 to 6 h)	4.0 (4.0–4.0)	4.0 (4.0–4.0)	0.592
Glasgow coma scale	14.0 (8.0–15.0)	12.5 (7.0–14.0)	0.445
Serum creatinine, mg/dL	1.7 (1.2–2.5)	1.9 (1.6–3.5)	0.441

Serum lactate, mmol/L	3.7 (1.9–6.1)	4.9 (3.1–7.8)	0.137
Parameters at 24 h			
Blood WBC count, 1000/ μ L	17.1 (9.2–22.0)	12.5 (9.6–17.4)	0.401
Blood hemoglobin level, g/dL	9.8 (9.0–10.8)	9.6 (8.5–10.3)	0.490
SOFA score (24 h)	7.0 (6.0–9.0)	11.0 (10.0–13.0)	< 0.001
P/F ratio, mmHg	263.7 (201.1–374.3)	185.7 (128.7–271.9)	0.016
Blood platelet count, 1000/ μ L	99.5 (65.0–131.0)	51.5 (36.0–103.0)	0.038
Serum total bilirubin, mg/dL	1.1 (0.5–2.4)	1.6 (0.8–2.4)	0.308
CV SOFA score (24 h)	3.0 (3.0–4.0)	4.0 (4.0–4.0)	0.013
Glasgow coma scale	14.0 (10.0–15.0)	9.5 (3.0–14.0)	0.009
Serum creatinine, mg/dL	1.2 (0.8–1.9)	2.0 (1.5–2.5)	0.022
Serum lactate, mmol/L	2.2 (1.6–3.2)	2.7 (2.1–7.1)	0.086
Parameters at 72 h			
Blood WBC count, 1000/ μ L	11.4 (7.4–15.9)	13.1 (8.5–15.7)	0.654
Blood hemoglobin level, g/dL	9.6 (8.6–10.5)	8.8 (8.3–9.5)	0.125

SOFA score (72 h)	7.0 (6.0–9.0)	11.0 (9.0–13.0)	0.005
P/F ratio, mmHg	308.7 (250.0–406.2)	220.2 (153.2–326.7)	0.014
Blood platelet count, 1000/ μ L	76.0 (43.0–120.0)	51.0 (25.0–82.0)	0.085
Serum total bilirubin, mg/dL	1.1 (0.6–2.7)	2.6 (1.0–4.0)	0.138
CV SOFA score (72 h)	3.0 (3.0–3.0)	3.0 (3.0–4.0)	0.089
Glasgow coma scale	14.0 (11.0–15.0)	11.0 (9.0–12.0)	0.008
Serum creatinine, mg/dL	0.9 (0.6–1.4)	1.5 (1.0–2.2)	0.049
Serum lactate, mmol/L	1.5 (1.2–2.2)	2.7 (1.8–4.5)	0.003

표 1. 28 일 사망 여부에 따른 기본 인구통계학적 자료. 자료는 평균 \pm 표준편차, 중간값(사분위 범위), 혹은 빈도(%)로 제시되었다.

[†]수술, 영상중재적 시술, 기타 감염원 조절 중 어느 한 가지라도 시행한 경우.

RRT, renal replacement therapy; NED, no evidence of disease; WBC, white blood cell; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; P/F ratio, ratio of partial pressure of arterial oxygen normalized to the fraction of inspired oxygen; CV, cardiovascular.

제3 항 혈중 칼리스타틴, VCAM-1, E-selectin 농도 비교

환자군과 건강한 자원자군을 비교했을 때, 혈중 칼리스타틴 농도는 환자군에서 더 낮게 측정되었고, VCAM-1과 E-selectin 농도는 더 높게 측정되었다[칼리스타틴, $4.1 \mu\text{g/mL}$ ($2.6\text{--}6.0 \mu\text{g/mL}$) 대 $13.3 \mu\text{g/mL}$ ($11.7\text{--}13.9 \mu\text{g/mL}$), $P < 0.001$; VCAM-1, $2.0 \mu\text{g/mL}$ ($1.4\text{--}3.0 \mu\text{g/mL}$) 대 $0.3 \mu\text{g/mL}$ ($0.3\text{--}0.4 \mu\text{g/mL}$), $P < 0.001$; E-selectin, 179.6 ng/mL ($74.5\text{--}306.3 \text{ ng/mL}$) 대 22.2 ng/mL ($21.3\text{--}24.2 \text{ ng/mL}$), $P < 0.001$] (그림 10).

혈중 칼리스타틴 농도는 입원 시, 24 시간 후, 72 시간 후 모두 사망군에 비해 생존군에서 더 높게 측정되었지만, 혈중 VCAM-1과 E-selectin 농도는 세 시점 모두에서 두 군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다(표 2, 그림 10).

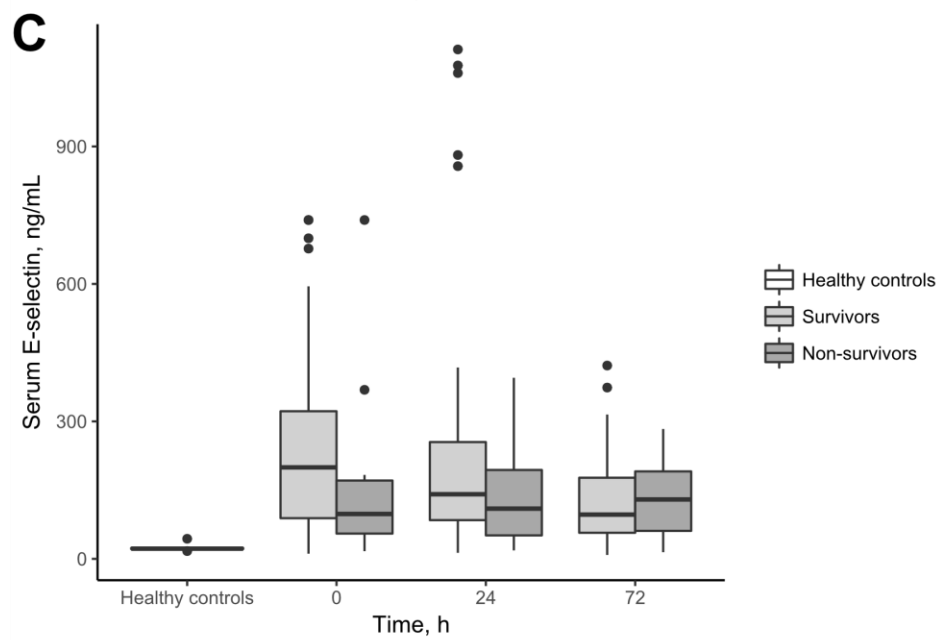
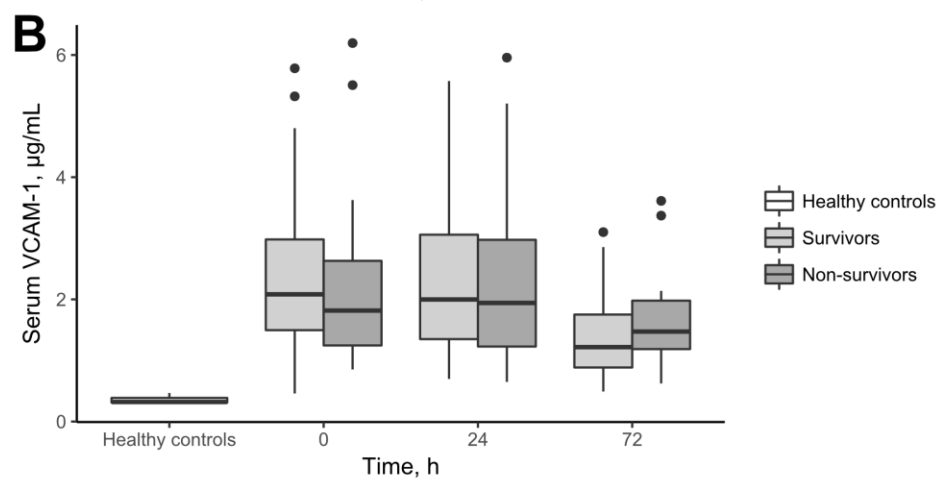
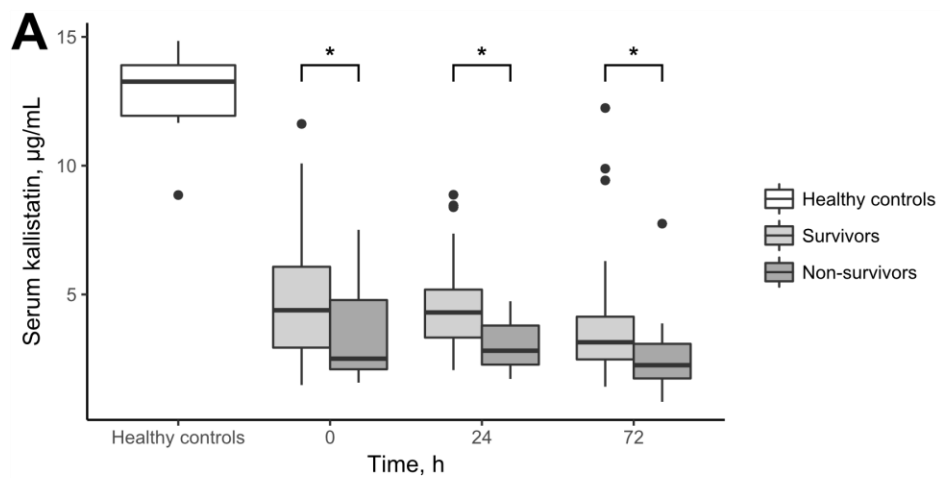


그림 10. 건강한 자원자와 환자(입원 시, 입원 24 시간 후, 입원 72 시간 후)로부터 측정한 혈중 (A) 칼리스타틴, (B) VCAM-1, (C) E-selectin 농도를 나타낸 상자 수염 그림. 상자 그림의 굵은 가로선은 중간값을, 상자 그림의 아래와 위 경계는 각각 제 1 사분위수와 제 3 사분위수를 나타내며, 아래와 위 수염은 각각 (제 1 사분위수 - $1.5 \times$ 사분위 범위)와 (제 3 사분위수 + $1.5 \times$ 사분위 범위)까지 연장되어 있다. 도표상의 점은 수염의 범위를 벗어난 값들에 해당한다.

* $P < 0.05$.

VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

	Healthy volunteers (n = 6)	Survivors (n = 58)	Non-survivors (n = 14)	<i>P</i> value [†]
At admission				
Kallistatin, μ g/mL	13.3 (11.7–13.9)	4.4 (2.9–6.1)	2.5 (2.1–5.0)	0.019
VCAM-1, μ g/mL	0.3 (0.3–0.4)	2.1 (1.5–3.0)	1.8 (1.2–2.7)	0.680
E-selectin, ng/mL	22.2 (21.3–24.2)	199.6 (83.0–327.2)	97.9 (51.6–178.9)	0.053
At 24 h				
Kallistatin, μ g/mL		4.3 (3.3–5.2)	2.8 (2.2–3.8)	0.002
VCAM-1, μ g/mL		2.0 (1.3–3.1)	1.9 (1.2–3.3)	0.809
E-selectin, ng/mL		141.0 (82.5–257.3)	109.6 (49.8–214.5)	0.255
At 72 h				
Kallistatin, μ g/mL		3.1 (2.5–4.2)	2.3 (1.7–3.1)	0.012
VCAM-1, μ g/mL		1.2 (0.9–1.8)	1.5 (1.2–2.1)	0.232
E-selectin, ng/mL		96.5 (56.8–179.9)	129.6 (52.8–193.2)	0.809

표 2. 건강한 자원자, 28 일 생존군, 28 일 사망군 간의 혈중 칼리스타틴, VCAM-1, E-selectin 농도의 비교. 자료는 중간값(사분위 범위)로 제시되었다.

[†]생존군과 사망군 사이에 시행한 맨-휘트니 U 검정에 대한 유의 확률.

VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

제4 항 로지스틱 회귀 분석

단변수 로지스틱 회귀 분석 결과, 입원 시 혈중 백혈구 수치, 24 시간 후와 72 시간 후 혈중 젖산 농도, 24 시간 후와 72 시간 후 SOFA 점수, 그리고 24 시간 후 혈중 칼리스타틴 농도가 28 일 사망과 유의한 연관성을 보였다. 단계적 선택법을 통하여 다변수 로지스틱 회귀 모형을 결정하였고, 당뇨병, 입원 시 혈중 백혈구 수치, 24 시간 후 SOFA 점수, 그리고 24 시간 후 혈중 칼리스타틴 농도가 최종 모형의 변수로 선택되었다. 다변수 로지스틱 회귀 분석 결과, 당뇨병, 24 시간 후 SOFA 점수, 그리고 24 시간 후 혈중 칼리스타틴 농도가 28 일 사망과 독립적인 연관성을 보였다(표 3).

	Unadjusted OR	95% CI	<i>P</i> value	Adjusted OR [†]	95% CI	<i>P</i> value
Age	0.99	0.95–1.05	0.820			
Male sex	2.03	0.60–8.09	0.274			
Diabetes mellitus	3.14	0.93–10.78	0.063	27.99	3.48–484.23	0.007
Solid malignancy with metastasis	4.75	0.78–27.53	0.077			
Blood WBC count						
Admission	0.91	0.84–0.98	0.029	0.90	0.78–0.99	0.080
24 h	0.96	0.90–1.02	0.233			
72 h	1.01	0.94–1.08	0.723			
Infection site						
Unknown	Reference					
Lung	0.46	0.02–1.30	0.606			
Urinary tract	0.14	0.00–4.56	0.225			
Gastrointestinal tract	0.50	0.02–1.49	0.653			
Hepatobiliary system	0.00	NA [§]	0.990			
Bone, joint, soft tissue	0.33	0.01–1.42	0.547			
Source control	0.29	0.04–1.21	0.131			

Serum lactate level						
Admission	1.10	0.97-1.25	0.139			
24 h	1.40	1.10-1.85	0.009			
72 h	1.39	1.04-2.06	0.047			
SOFA score						
Admission [†]	1.18	0.96-1.47	0.131			
24 h	1.51	1.20-2.02	0.002	1.57	1.09-2.55	0.032
72 h	1.31	1.09-1.63	0.006			
Serum kallistatin level						
Admission	0.71	0.48-0.97	0.052			
24 h	0.38	0.18-0.69	0.004	0.29	0.08-0.69	0.024
72 h	0.61	0.32-0.98	0.090			

표 3. 28 일 사망에 대한 로지스틱 회귀 분석 결과. 입원 시 혈중 백혈구 수치(3 명), 72 시간 후 혈중 백혈구 수치(1 명), 입원 시 혈중 젖산 농도(2 명), 24 시간 후 혈중 젖산 농도(8 명), 72 시간 후 혈중 젖산 농도(2 명), 그리고 72 시간 후 SOFA 점수(1 명)이 결측값으로 확인되었다. 결측값은 동일 군 내에서 측정 가능한 값들의 평균으로 대체하였다. 단변수 분석에서 유의 확률 0.10 미만인 변수들을

이용하여 단계적 선택법을 통해 다변수 로지스틱 회귀 모형을 구하였다.

[†]최종 다변수 모형은 당뇨병, 입원 시 혈중 백혈구 수치, 24 시간 후 SOFA 점수, 그리고 24 시간 후 혈중 칼리스트타틴 농도를 이용하여 만들어졌다.

[‡]입원 후 6 시간까지 SOFA 점수의 최댓값.

[§]사망군에서 간담도계 감염의 빈도가 0으로 교차비 계산이 불가능함.

OR, odds ratio; CI, confidence interval; WBC, white blood cell; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; NA, not available.

제4 장 고찰

실험 연구에서 SERPINA4 siRNA 형질주입은 HUVEC 배양액 내 칼리스타틴 농도를 유의하게 감소시켰다. SERPINA4 siRNA + LPS군에서는 control siRNA군과 비교했을 때 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도가 유의하게 낮았고, 음성 대조군, control siRNA군, 그리고 SERPINA4 siRNA군과 비교했을 때 24 시간 생존력이 유의하게 감소하였으며, 음성 대조군, control siRNA군, control siRNA + LPS군, 그리고 SERPINA4 siRNA군과 비교했을 때 세포 배양액 내 eNOS 농도가 유의하게 낮았다.

임상 연구에서 패혈성 쇼크 환자 중 28 일 생존군에서의 혈중 칼리스타틴 농도가 사망군에 비해 세 시점 모두에서(입원 시, 24 시간 후, 72 시간 후) 유의하게 높았지만, 혈중 VCAM-1이나 E-selectin 농도는 두 군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한 입원 24 시간 후 혈중 칼리스타틴 농도는 28 일 사망과 독립적인 연관성을 보였다.

혈관내피 활성화는 감염에 대한 정상적인 적응 반응으로 발생한다(9). 혈관내피 활성화는 혈액응고의 촉진, 세포부착의 촉진, 혈관운동성의 변화, 혈관 투과성의 증가, 그리고 혈관내피 세포의 세포자멸사 등의 특징을 지닌다(7). 패혈증 등의 특정 상황에서 이러한 과정이 정상적으로 조절되지 않을 경우 혈관 긴장도의 현저한 감소, 미세혈관 관류의 미만적인 변화, 전신 혈관 투과성의 증가, 혈관내 파종성 응고 등의 결과가 나타난다(9). 혈관내피 활성화와 연관된 표지자의 혈중 농도와 패혈증의 예후와의 관계에 대한 여러 연구가 있었으나, 그

결과가 일관되게 보고되지는 않고 있다(22).

본 실험 연구에서 SERPINA4 siRNA 형질주입을 통한 칼리스타틴 생성 억제제는 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도를 감소시켰고, 또한 지질다당류 처리를 시행한 HUVEC의 세포 배양액 내 eNOS 농도와 생존력을 유의하게 감소시켰다. SERPINA4 siRNA + LPS군에서는 control siRNA + LPS군과 비교했을 때 세포 배양액 내 eNOS 농도가 유의하게 감소하였고, 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도와 생존력이 감소하는 경향을 보였으나 이 차이는 통계적으로 유의하지는 않았다. 그럼에도 불구하고 이러한 일관된 경향성은 패혈증이나 패혈성 쇼크에서 칼리스타틴 농도 저하가 더 심한 혈관내피 기능 부전과 연관성이 있을 가능성과 칼리스타틴의 혈관내피 보호 작용에는 eNOS 경로가 관여하고 있을 가능성을 시사한다.

임상 연구에서는 28 일 생존군과 사망군 사이에 혈중 칼리스타틴 농도의 차이가 관찰된 반면 혈중 VCAM-1이나 E-selectin 농도의 차이는 관찰되지 않았다. 임상 연구에 참여한 환자들의 질병의 중증도 높았다는 점이 이러한 결과에 대한 설명 중 하나일 수 있다. 기존에 패혈증 환자에서 혈중 VCAM-1 혹은 E-selectin 농도와 사망률과의 연관성이 있음을 보고했던 연구에는 다양한 중증도의 패혈증 환자들이 포함되었다(23, 24). 본 연구에는 패혈증의 가장 심각한 형태인 패혈성 쇼크 환자만이 참여하였고, 따라서 혈관내피 활성화의 정도가 두 군 모두에서 충분히 심각하여 실질적으로 표지자 농도의 차이를 보이지 않았을 수 있다. 또한, Aird 등(25)의 연구에 따르면 기능 장애가 발생한 혈관내피 조직은 정상적인 적응 반응의 과활성화부터 완벽한 침묵 상태까지 다양한 반응을 보일 수가 있는데, 이로 인하여 혈관내피 활성화와 연관된 표지자의 혈중 농도가 차이를 보이지 않았을 수 있다.

칼리스타틴은 종양, 당뇨병, 간경화 등 다양한 질환의 병태생리 과정에서 여러 전달 경로를 통하여 관여하는 것으로 알려져 있다 (26-30). 기존의 다균 패혈증 마우스(polymicrobial sepsis mouse) 모형을 이용한 연구에서 칼리스타틴 투여는 용량 의존적으로 혈중 TNF- α , IL-6, HMGB1 농도를 감소시키고 생존률을 향상시켰다(13). 또한 Li 등(31)은 패혈증 랫드 모형에서 치료를 하지 않은 군과 비교했을 때 지연된 칼리스타틴 투여 역시 신장, 폐, 간 손상을 감소하고 생존률을 향상시키는 것을 보고하였다. 패혈증에서 칼리스타틴은 다양한 기전을 통하여 보호 효과를 발휘하는 것으로 생각되는데, eNOS의 유도, HMGB1 등의 염증성 물질, toll-유사 수용체 4 (toll-like receptor 4, TLR4), VCAM-1 등의 억제, nuclear factor- κ B (NF- κ B) 활성화의 억제, caspase-3 활성화와 세포 자멸사 억제, 그리고 suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) 발현의 증가 등의 기전이 포함된다. 최근 한 연구에서는 패혈증과 패혈성 쇼크가 혼재된 환자군에서 높은 혈중 칼리스타틴 농도가 5일 동안 낮은 SOFA 점수와 60 일 생존률과 독립적으로 연관이 있음을 보고한 바 있는데(19), 본 연구에서는 패혈성 쇼크 환자만을 연구에 포함하여 연구 대상자의 동질성을 높인 점이 차이가 있다고 하겠다.

실험 연구 중 control siRNA 형질주입을 시행한 HUVEC에서 패혈증을 모방하기 위한 지질다당류 처리는 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도를 유의하게 감소시켰고, 임상 연구에서는 건강한 자원자에 비해 패혈성 쇼크 환자에서 혈중 칼리스타틴 농도가 낮게 측정되었다. 이는 패혈증이나 지역사회 획득 폐렴 환자에서 혈중 칼리스타틴 농도가 감소함을 보고하였던 기존 연구의 결과와도 유사하고(17, 18), 또한 칼리스타틴이 체내에서 소모되면서 방어 작용을 할 가능성을 시사한다.

VCAM-1과 E-selectin의 혈중 농도가 사망군과 생존군 사이에 차이를 보이지 않았음에도 불구하고 혈중 칼리스타틴 농도는 두 군 사이에 유의한 차이를 보였는데, 이는 패혈성 쇼크 환자에서 혈관내피 활성화와 연관된 표지자만으로는 예후 예측이 어려운 상황에서도 혈중 칼리스타틴 농도는 예후 예측 지표로 사용될 수 있을 만한 가능성을 시사한다. 본 연구에서 비록 혈관내피 기능 장애의 정도라고 하는 한 가지 요인이 패혈성 쇼크 환자의 예후에 유의한 영향을 미치지 못하였더라도, 서론에서 언급하였던 칼리스타틴의 다양한 작용이 임상적인 결과에 다방면으로 작용했을 것으로 생각된다. 향후 칼리스타틴이 패혈성 쇼크 환자에서 어떤 전달 경로에 관여하고 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요하겠다.

본 연구의 제한점은 다음과 같이 제시할 수 있다. 실험 연구에서는 먼저 control siRNA + LPS군과 SERPINA4 siRNA + LPS군 사이의 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도와 세포 생존력의 차이를 통계적으로 유의하게 밝혀내지 못한 점이 지적되어야 하겠다. 다만 SERPINA4 siRNA + LPS군에서 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도, 세포 생존력, 그리고 세포 배양액 내 eNOS 농도가 상대적으로 감소하는 경향이 일관성 있게 관찰되어, 더 많은 세포주를 이용한 실험에서는 이 경향성이 통계적으로 유의하게 입증될 수 있을 것으로 기대한다. 또, 길항 물질 처리를 통해 eNOS의 작용을 차단하여 실제로 칼리스타틴이 eNOS와 연관된 경로를 통해 세포 생존력에 관여하는지 여부를 직접 관찰하지 못한 점도 본 연구의 한계로 제시할 수 있겠다.

임상 연구의 제한점으로는 먼저 후향적 연구의 특성으로 인해 교란 변수가 완벽히 통제되지 않았다는 점을 지적할 수 있다. 그러나 국제적인 치료 지침에 의거한 표준화된 진료를 통해 교란 변수에 의한

영향이 상당수 통제되었을 것으로 생각된다. 또한 상대적으로 적은 연구 대상자 수를 연구의 제한점으로 꼽을 수 있다. 일례로, 인구통계학적 특성에서 생존군과 사망군 사이에 감염 병소나 감염원 조절에 있어 통계적으로 유의한 차이가 확인되지 않았는데, 이는 적은 대상자 수로 인해 검정력이 부족하였기 때문으로 생각된다. 그러나 적은 연구 대상자를 대상으로 한 연구임에도 불구하고 혈중 칼리스트타틴 농도는 사망군과 생존군 사이에 유의한 차이를 보였기에, 다수의 연구 대상자를 포함한 후속 연구가 본 연구의 결과를 더 공고히 해줄 것으로 기대한다. 마지막으로 세 번의 채혈을 완료하지 못한 환자를 연구에서 제외했다는 점이 선택 편향을 일으킬 수 있다고 지적할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 세 번의 채혈을 모두 완료한 환자들을 분석함으로써 사망군의 혈중 칼리스트타틴 농도가 생존군에 비해 꾸준히 낮게 유지되고, 28 일 생존 여부와 관계없이 시간이 지남에 따라 혈중 칼리스트타틴 농도가 감소하는 경향을 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

제5 장 결론

SERPINA4 siRNA군에서는 음성 대조군이나 control siRNA군과 비교했을 때 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도가 유의하게 감소하였다. SERPINA4 siRNA + LPS군에서는 음성 대조군과 비교했을 때 세포 배양액 내 칼리스타틴 농도가 유의하게 감소하였고, 음성 대조군, control siRNA군, 그리고 SERPINA4 siRNA군과 비교했을 때 세포 생존력이 유의하게 감소하였으며, 음성 대조군, control siRNA군, SERPINA4 siRNA군, 그리고 SERPINA4 siRNA + LPS군과 비교했을 때 세포 배양액 내 eNOS 농도가 유의하게 감소하였다. 패혈성 쇼크 환자에서 입원 24 시간 후 측정된 낮은 혈중 칼리스타틴 농도는 28 일 사망과 독립적인 연관성이 관찰되었으나, 혈중 VCAM-1이나 E-selectin 농도는 28 일 사망과의 연관성이 관찰되지 않았다.

이상의 연구 결과를 종합했을 때, 패혈성 쇼크에서 칼리스타틴의 결핍은 eNOS 생성의 감소와 연관되어 혈관내피 세포 생존력을 감소시켰다. 그러나 패혈성 쇼크 환자를 대상으로 한 임상 연구에서는 칼리스타틴의 결핍과 28 일 사망과의 연관성이 확인되었음에도 불구하고 혈중 VCAM-1이나 E-selectin 농도와 28 일 사망과의 연관성은 관찰되지 않았는데, 이는 패혈성 쇼크에서 칼리스타틴이 혈관내피 세포의 eNOS 생성에 대한 작용 외에도 다양한 보호 기전에 관여하고 있음을 시사한다. 본 연구를 통하여 미처 밝히지 못한 작용 기전에 대해서는 후속 연구의 진행이 필요할 것으로 여겨진다.

이해관계의 충돌 등에 관한 명기

본 연구에 사용된 연구비의 일부는 서울대학교병원(과제 번호 25-2016-0040)으로부터 지원받았으며, 언급할 만한 이해관계의 충돌은 없다. 본 논문은 Kim 등(32)이 발표한 논문의 내용을 포함하고 있다.

참고 문헌

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992;101(6):1644–55.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar–Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis–3). JAMA. 2016;315(8):801–10.
3. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. Crit Care Med. 2013;41(5):1167–74.
4. Meyer N, Harhay MO, Small DS, Prescott HC, Bowles KH, Gaieski DF, et al. Temporal Trends in Incidence, Sepsis–Related Mortality, and Hospital–Based Acute Care After Sepsis. Crit Care Med. 2018;46(3):354–60.
5. Vail E, Gershengorn HB, Hua M, Walkey AJ, Rubenfeld G, Wunsch H. Association Between US Norepinephrine Shortage and Mortality Among Patients With Septic Shock. JAMA. 2017;317(14):1433–42.
6. Russell JA, Rush B, Boyd J. Pathophysiology of Septic Shock.

Crit Care Clin. 2018;34(1):43–61.

7. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765–77.

8. Ait–Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36(8):1286–98.

9. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina–Tascon GA, et al. The Endothelium in Sepsis. *Shock*. 2016;45(3):259–70.

10. Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence*. 2013;4(6):507–16.

11. Amalakuhan B, Habib SA, Mangat M, Reyes LF, Rodriguez AH, Hinojosa CA, et al. Endothelial adhesion molecules and multiple organ failure in patients with severe sepsis. *Cytokine*. 2016;88:267–73.

12. Chao J, Tillman DM, Wang MY, Margolius HS, Chao L. Identification of a new tissue–kallikrein–binding protein. *Biochem J*. 1986;239(2):325–31.

13. Li P, Bledsoe G, Yang ZR, Fan H, Chao L, Chao J. Human kallistatin administration reduces organ injury and improves survival in a mouse model of polymicrobial sepsis. *Immunology*. 2014;142(2):216–26.

14. Yin H, Gao L, Shen B, Chao L, Chao J. Kallistatin inhibits vascular inflammation by antagonizing tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor kappaB activation. *Hypertension*. 2010;56(2):260–7.
15. Shen B, Gao L, Hsu YT, Bledsoe G, Hagiwara M, Chao L, et al. Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(5):H1419–27.
16. Shen B, Smith RS, Jr., Hsu YT, Chao L, Chao J. Kruppel-like factor 4 is a novel mediator of Kallistatin in inhibiting endothelial inflammation via increased endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem*. 2009;284(51):35471–8.
17. Chao J, Schmaier A, Chen LM, Yang Z, Chao L. Kallistatin, a novel human tissue kallikrein inhibitor: levels in body fluids, blood cells, and tissues in health and disease. *J Lab Clin Med*. 1996;127(6):612–20.
18. Lin WC, Lu SL, Lin CF, Chen CW, Chao L, Chao J, et al. Plasma kallistatin levels in patients with severe community-acquired pneumonia. *Crit Care*. 2013;17(1):R27.
19. Lin WC, Chen CW, Chao L, Chao J, Lin YS. Plasma kallistatin in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. *PLoS One*. 2017;12(5):e0178387.
20. Chao J, Bledsoe G, Chao L. Protective Role of Kallistatin in Vascular and Organ Injury. *Hypertension*. 2016;68(3):533–41.
21. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal

- SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med. 2013;41(2):580–637.
22. Xing K, Murthy S, Liles WC, Singh JM. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis—a systematic review. Crit Care. 2012;16(1):R7.
23. Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. Crit Care. 2010;14(5):R182.
24. Hofer S, Brenner T, Bopp C, Stepan J, Lichtenstern C, Weitz J, et al. Cell death serum biomarkers are early predictors for survival in severe septic patients with hepatic dysfunction. Crit Care. 2009;13(3):R93.
25. Aird WC. Endothelial cell dynamics and complexity theory. Crit Care Med. 2002;30(5 Suppl):S180–5.
26. Cheng Z, Lv Y, Pang S, Bai R, Wang M, Lin S, et al. Kallistatin, a new and reliable biomarker for the diagnosis of liver cirrhosis. Acta Pharm Sin B. 2015;5(3):194–200.
27. El-Asrar MA, Andrawes NG, Ismail EA, Salem SM. Kallistatin as a marker of microvascular complications in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: Relation to carotid intima media thickness. Vasc Med. 2015;20(6):509–17.
28. Gateva A, Assyov Y, Velikova T, Kamenov Z. Increased kallistatin levels in patients with obesity and prediabetes compared to normal glucose tolerance. Endocr Res. 2017;42(2):163–8.

29. Ma C, Luo C, Yin H, Zhang Y, Xiong W, Zhang T, et al. Kallistatin inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of gastric cancer by downregulating VEGF-C expression and secretion. *Gastric Cancer*. 2018;21(4):617–31.
30. Sun HM, Mi YS, Yu FD, Han Y, Liu XS, Lu S, et al. SERPINA4 is a novel independent prognostic indicator and a potential therapeutic target for colorectal cancer. *Am J Cancer Res*. 2016;6(8):1636–49.
31. Li P, Guo Y, Bledsoe G, Yang ZR, Fan H, Chao L, et al. Kallistatin treatment attenuates lethality and organ injury in mouse models of established sepsis. *Crit Care*. 2015;19:200.
32. Kim T, Suh GJ, Kwon WY, Kim KS, Jung YS, Shin SM. Lower serum kallistatin level is associated with 28-day mortality in patients with septic shock. *J Crit Care*. 2018;48:328–33.

Abstract

The Mechanism of Action of Kallistatin in Septic Shock

Kim Taegyun

Department of Emergency Medicine

College of Medicine

The Graduate School

Seoul National University

Introduction

Kallistatin has anti-inflammatory effect by various mechanisms and it also attenuates endothelial dysfunction through endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-associated pathways. The objective of this study was to investigate the mechanism of action of kallistatin in endothelial cell experimental model mimicking sepsis and to investigate whether serum levels of kallistatin, and biomarkers associated with endothelial dysfunction are associated with clinical outcomes in patients with septic shock

Materials and methods

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into five groups for experiments: cells without treatment (negative control group), cells transfected with control small interfering ribonucleic acid (siRNA) only (control siRNA group), cells transfected with control siRNA and treated with lipopolysaccharide (LPS) (control siRNA + LPS group), cells transfected with SERPINA4 siRNA (SERPINA4 siRNA group) and cells transfected with SERPINA4 siRNA and treated with LPS (SERPINA4 siRNA + LPS group). Cell viability, kallistatin level and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) level in the culture medium were measured for each group. For clinical investigation, serum levels of kallistatin, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and E-selectin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay using blood samples obtained at admission, at 24 h, and at 72 h after admission from the patients with septic shock and from healthy volunteers. The primary outcome for the clinical investigation was 28-day mortality.

Results

In the SERPINA4 siRNA group, kallistatin level in the culture medium was decreased compared with the negative control group (2.5 ± 0.7 pg/mL vs. 21.1 ± 2.1 pg/mL, $P < 0.001$) and the control siRNA group (20.5 ± 3.3 pg/mL, $P < 0.001$). Kallistatin level in the medium was lower in the control siRNA + LPS group compared with the control siRNA group (12.0 ± 2.3 pg/mL vs.

21.3 \pm 3.6 pg/mL, $P = 0.046$). Kallistatin level in the medium was markedly lower in the SERPINA4 siRNA group (3.2 \pm 1.4 pg/mL, $P < 0.001$) and the SERPINA4 siRNA + LPS group (3.6 \pm 1.9 pg/mL, $P < 0.001$) compared with the control siRNA group, and there was no significant difference in kallistatin level in the medium between the two groups ($P = 0.999$). Relative cell viability was lower in the SERPINA4 siRNA + LPS group (58.0 \pm 3.7%) compared with the negative control group (100 \pm 7.9%, $P = 0.001$), the control siRNA group (98.2 \pm 9.0%, $P = 0.002$) and the SERPINA4 siRNA group (93.3 \pm 4.7%, $P = 0.007$). eNOS levels in the medium were lower in the control siRNA + LPS group (4.1 \pm 0.1 ng/mL, $P = 0.041$) and the SERPINA4 siRNA group (4.1 \pm 0.1 ng/mL, $P = 0.041$) compared with the control siRNA group (4.5 \pm 0.1 ng/mL). eNOS level in the medium was lower in the SERPINA4 siRNA + LPS group (3.7 \pm 0.1 ng/mL) compared with the negative control group (4.5 \pm 0.1 ng/mL, $P < 0.001$), the control siRNA group ($P < 0.001$), the control siRNA + LPS group ($P = 0.021$) and the SERPINA4 siRNA group ($P = 0.021$).

Fifty-eight survivors, fourteen non-survivors, and six healthy volunteers were enrolled for the clinical investigation. Serum kallistatin level was lower and serum VCAM-1 and E-selectin levels were higher in patients at admission compared with healthy volunteers. Compared with survivors, serum kallistatin levels were lower in non-survivors at all time points (4.4 μ g/mL [2.9–6.1] vs. 2.5 μ g/mL [2.1–5.0], $P = 0.019$ at admission; 4.3 μ g/mL [3.3–

5.2] vs. 3.2 $\mu\text{g/mL}$ [2.2–3.8], $P = 0.004$ at 24 h; 3.1 $\mu\text{g/mL}$ [2.5–4.2] vs. 2.3 $\mu\text{g/mL}$ [1.7–3.1], $P = 0.012$ at 72 h), while VCAM-1 and E-selectin levels showed no difference. In the multivariable logistic regression analysis, serum kallistatin level at 24 h was independently associated with 28-day mortality (odds ratio, 0.29; 95% confidence interval, 0.08–0.69, $P = 0.024$).

Conclusions

In the SERPINA4 siRNA group, kallistatin level in the medium was decreased compared with the negative control group and the control siRNA group. In the SERPINA4 siRNA + LPS group, kallistatin level in the medium was decreased compared with the negative control group, cell viability was lower compared with the negative control group, the control siRNA group and the SERPINA4 siRNA group and eNOS level in the medium was lower compared with the negative control group, the control siRNA group, the control siRNA + LPS group and the SERPINA4 siRNA group. Lower serum kallistatin level at 24 h was independently associated with 28-day mortality in patients with septic shock, but the levels of VCAM-1 or E-selectin were not.

Keywords: sepsis, endothelial dysfunction, biomarker

Student Number: 2017–30022